

Requested Patent: DE2629808A1

Title: ;

Abstracted Patent: DE2629808 ;

Publication Date: 1978-01-05 ;

Inventor(s):

FLEMMING WOLFGANG ING GRAD, FRESENIUS REMIGIUS, GEHM STEFAN ING  
GRAD ;

Applicant(s): FRESENIUS INST ;

Application Number: DE19762629808 19760702 ;

Priority Number(s): DE19762629808 19760702 ;

IPC Classification: C07G7/02; G01N31/14 ;

Equivalents: ;

ABSTRACT:

(51)

Int. Cl. 2:

**C 07 G 7/02**(19) **BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND****G 01 N 31/14****DE 26 29 808 A 1**

(11)

**Offenlegungsschrift 26 29 808**

(21)

Aktenzeichen:

**P 26 29 808.8**

(22)

Anmeldetag:

**2. 7. 76**

(43)

Offenlegungstag:

**5. 1. 78**

(54)

Unionspriorität:

(15) (16) (17) —

(57)

Bezeichnung:

**Verfahren zur Stabilitätsverbesserung von Dehydrogenasen**

(71)

Anmelder:

**Institut Fresenius Chemische und Biologische Laboratorien GmbH,  
6204 Taunusstein**

(72)

Erfinder:

**Fresenius, Remigius, 6209 Heidenrod; Flemming, Wolfgang, Ing.(grad.),  
6451 Neuberg; Gehm, Stefan, Ing.(grad.), 6204 Taunusstein****DE 26 29 808 A 1**

## P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verfahren zur Stabilitätsverbesserung von Dehydrogenasen, insbesondere Alkohol-Dehydrogenase, in wässriger Lösung oder trägergebundenen Zustand durch Zugabe von Phosphatpuffer, Albumin und Glycin zu der mit der Dehydrogenase in Berührung stehenden Behandlungslösung, dadurch gekennzeichnet, daß man zu der Behandlungslösung zusätzlich Cystein zugibt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cystein der Behandlungslösung in einem Molverhältnis von Cystein zu Glycin von 0,0001 bis 0,1 : 1, vorzugsweise von 0,001 bis 0,02 : 1 zusetzt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man das Cystein der Behandlungslösung in einer Konzentration von 0,1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 10, besonders 2 bis 6 mg/l zusetzt.
4. Verfahren nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß man der Behandlungslösung zusätzlich wenigstens einen wasserlöslichen Komplexbildner für mehrwertige Metallionen, vorzugsweise Äthylendiamintetraessigsäure, zusetzt.

709881/0489

BAD ORIGINAL

COPY 7

5. Verfahren nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß man der Behandlungslösung ein Bakteriostatikum, vorzugsweise Natriumazid, zusetzt.
6. Verfahren nach Anspruch 1-5 unter Verwendung von Alkohol-Dehydrogenase, dadurch gekennzeichnet, daß man der Behandlungslösung ein Abfangmittel für Aldehyd, vorzugsweise Serin, zusetzt.
7. Wässrige Behandlungslösung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1-6 mit einem Gehalt an Phosphatpuffer, Albumin und Glycin, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlungslösung zusätzlich Cystein enthält.
8. Behandlungslösung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Cystein in einem Molverhältnis von Cystein zu Glycin von 0,001 bis 0,1 : 1, vorzugsweise von 0,001 bis 0,02 : 1 enthält.
9. Behandlungslösung nach Anspruch 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Cystein in einer Konzentration von 0,1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 10, besonders 2 bis 6 mg/l enthält.
10. Behandlungslösung nach Anspruch 7-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach Glycin in einer Konzentration von 0,1 bis 10, vorzugsweise von 1 bis 5 g/l enthält.

11. Behandlungslösung nach Anspruch 7-10, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Albumin in einer Konzentration von 0,1 bis 5, vorzugsweise von 0,5 bis 1 g/l enthält.
12. Behandlungslösung nach Anspruch 7-11, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich wenigstens einen wasser-löslichen Komplexbildner für mehrwertige Metallionen, vorzugsweise Äthylendiamintetraessigsäure, enthält.
13. Behandlungslösung nach Anspruch 7-12, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein Bakteriostatikum, vorzugsweise Natriumazid, enthält.
14. Behandlungslösung nach Anspruch 7-13 zur Alkoholbestimmung mit Hilfe von Alkohol-Dehydrogenase, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich ein Abfangmittel für Aldehyd, vorzugsweise Serin, enthält.
15. Behandlungslösung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Coenzym, vorzugsweise Nikotinamid-adenin-dinucleotid enthält.

Dr. Hans-Heinrich Willrath  
Dr. Dieter Weber  
Dipl.-Phys. Klaus Seiffert  
PATENTANWÄLTE

- 4 -

2629808  
D-62 WIESBADEN 1  
TT/P Postfach 6145  
Gustav-Freytag-Straße 25  
40 404181 37 87 00  
Telegraphenadresse: WILLPATENT  
Tele: 4-110 847  
1. Juli 1976

Institut Fresenius Chemische und Biologische  
Laboratorien GmbH, 6204 Taunusstein-Neuhof

-----  
Verfahren zur Stabilitätsverbesserung von  
Dehydrogenasen  
-----

Dehydrogenasen und andere Enzyme werden in zahlreichen biochemischen, insbesondere quantitativ-analytischen Verfahren verwendet, beispielsweise ist es aus "Methoden der enzymatischen Analyse", H.U. Bergmeyer Verlag Chemie Weinheim, 3. neu bearbeitete und erweiterte Auflage 1974, Band II, Seiten 1545 bis 1551 bekannt, Äthanol etwa in Blut oder Urin quantitativ in der Weise zu bestimmen, daß man der Äthanolhaltigen Lösung Nikotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) als Coenzym und außerdem Alkohol-Dehydrogenase (ADH) als katalysierendes Enzym zusetzt und dabei Acetaldehyd und die reduzierte Form des Nikotinamid-adenin-dinucleotids (NADH) bekommt. Da die Bildung von NADH, gemessen an der Extinktionszunahme bei 340 (334, 365) nm, der Äthanolmenge in der Bestimmungslösung proportional ist, läßt sich durch Bestimmung der Extinktion für NADH mit Hilfe eines Spektralphotometers der

/2

709881/0489

- 2 -  
- 5 -

Äthanolgehalt in der Bestimmungslösung quantitativ ermitteln.

Dehydrogenasen sind größtenteils mehr oder weniger empfindlich und verlieren daher schnell ihre Aktivität. Daher ist es allgemein üblich, derartige Enzyme in wässriger Lösung zu verwenden und die Lösung kurz vor der Verwendung anzusetzen. Dies gilt insbesondere für die Alkohol-Dehydrogenase, die besonders empfindlich ist, so daß bereits geringste Konzentrationen an Inhibitoren zur sofortigen Umsetzung mit den freien SH-Gruppen im Molekül und zu einer Schädigung des Enzyms führen. Zu den Inhibitoren der ADH zählen alle Schwermetallionen, Chloridionen und andere Verbindungen.

Aus der oben zitierten Literaturstelle in "Methoden der enzymatischen Analyse" ist es bekannt, der Behandlungslösung zur Verbesserung der Stabilität Puffer zuzusetzen, insbesondere Natriumpyrophosphat, doch können auch andere Phosphatpuffer, Tris- oder Tris-Puffer verwendet werden. Aus der US-PS 3 493 467 ist es weiterhin bekannt, der Behandlungslösung bei der Äthanolbestimmung außer einem Phosphatpuffer noch Albumin und Glycin zuzusetzen.

In neuerer Zeit ist man mehr und mehr bestrebt, derartige Verfahren nicht mit gelösten Enzymen, sondern mit trägergebundenen Enzymen durchzuführen, da in diesen Fall das Enzym immer wieder verwendet werden kann. Derartige Methoden verlan-

gen aber eine sehr viel höhere Stabilität des Enzyms als bei Verwendung in wässriger Lösung, da die trägergebundenen Enzyme potentiellen Inhibitoren sehr viel länger ausgesetzt sind. Aus diesem Grund war es bisher nicht möglich, bestimmte Dehydrogenasen in trägergebundener Form zu verwenden, was insbesondere für die Alkohol-Dehydrogenase gilt.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, die Stabilität von Dehydrogenasen und besonders von Alkohol-Dehydrogenase in Berührung mit der Behandlungslösung weiter zu verbessern, so daß man die Dehydrogenasen über längere Zeiträume in Berührung mit der Behandlungslösung belassen kann. Die Lösung dieser Aufgabe ist Voraussetzung für die Verwendung der Dehydrogenasen in trägergebundenem Zustand.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Stabilitätsverbesserung von Dehydrogenasen, insbesondere von Alkohol-Dehydrogenase, in wässriger Lösung oder trägergebundenem Zustand durch Zugabe von Phosphatpuffer, Albumin und Glycin zu der Behandlungslösung, mit der die Dehydrogenasen in Berührung stehen, ist dadurch gekennzeichnet, daß man zu der Behandlungslösung zusätzlich Cystein zugibt.

Überraschenderweise wurde nämlich gefunden, daß die Kombination von Phosphatpuffer, Albumin, Glycin und Cystein in der Behandlungslösung, mit der die Dehydrogenasen in Berührung stehen, eine sprunghafte Stabilitätsverbesserung für die Dehydrogenasen



- 4 -  
- 7 -

erbringt, so daß es möglich ist, entweder wässrige Lösungen der Dehydrogenasen über längere Zeiträume stehenzulassen oder, was wichtiger ist, die Dehydrogenasen in trägergebundene Zustand einzusetzen.

Das Cystein ist als Stabilitätsverbesserer in Kombination mit den anderen genannten Komponenten bereits in sehr geringen Konzentrationen wirksam. Zweckmäßig setzt man Cystein und Glycin der Behandlungslösung in einem Molverhältnis von Cystein zu Glycin von 0,0001 bis 0,1 : 1, vorzugsweise von 0,001 bis 0,02 : 1 zu. Betrachtet man die Konzentration der Bestandteile in der Behandlungslösung, so ist es zweckmäßig, eine Behandlungslösung zu verwenden, die das Cystein in einer Konzentration von 0,1 bis 20, vorzugsweise 1-10, besonders 2 bis 6 mg pro Liter enthält. Das Glycin enthält die Behandlungslösung zweckmäßig in einer Konzentration von 0,1 bis 10 aber vorzugsweise von 1 bis 5 g je Liter. Das Albumin enthält sie zweckmäßig in einer Konzentration von 0,1 bis 5, vorzugsweise von 0,5 bis 1 g je Liter.

Der Phosphatpuffer, vorzugsweise Natriumprophosphat, wird der Behandlungslösung in üblichen, aus dem Stand der Technik bekannten Konzentrationen zugesetzt, um den bekanntermaßen für das betreffende Enzym erforderlichen pH-Wert zu bekommen. Für Alkohol-Dehydrogenase liegt das pH-Optimum beispielsweise bei pH 8,5.

- 8 -  
- 8 -

Wie erwähnt, gehören zu den Inhibitoren insbesondere der Alkohol-Dehydrogenase alle Schwermetallionen, die sich in den meisten Bestimmungslösungen finden, wie in Blut, im Serum, im Urin oder in alkoholischen Getränken, wie im Wein. Aus diesen Grund ist es bevorzugt, der Behandlungslösung zusätzlich noch wenigstens einen wasserlöslichen Komplexbildner für mehrwertige Metallionen zuzusetzen. Derartige Komplexbildner sind beispielsweise Äthylendiamintetraessigsäure, verschiedene Metallsalze derselben, wie das Dinatriumsalz, Magnesium-Dikaliumsalz oder Zink-Dinatriumsalz, sowie Nitrilotriessigsäure. Äthylendiamintetraessigsäure ist für die Erfindung der bevorzugt verwendete Komplexbildner.

Bei der Zugabe des Komplexbildners ist zu beachten, daß dieser der Behandlungslösung in einer Konzentration zugegeben wird, die nicht selbst inhibierend auf die Dehydrogenase einwirkt. Beispielsweise zählt Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu den Inhibitoren für Alkohol-Dehydrogenase, wenn sie in bestimmten Konzentrationen eingesetzt wird. Bei der Zugabe von 0,1 Mol EDTA je Liter der Behandlungslösung tritt bereits eine etwa 10 %ige Inhibierung ein. Es ist daher zweckmäßig, den Komplexbildner, insbesondere die EDTA in einer Menge von 0,0001 bis 0,01, vorzugsweise in einer Menge von 0,01 bis 0,05 Mol je Liter Behandlungslösung zuzugeben.

Insbesondere bei Verwendung trägergebundener Dehydrogenasen ist es weiterhin bevorzugt, der Behandlungslösung ein Bakterio-

- 8 -  
- 9 -

statikum zuzusetzen, das der Stabilisierung insbesondere des Trägers selbst dient. Es können ansich bekannte Bakteriostatika hierzu verwendet werden, doch ist es bevorzugt, Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) zu verwenden. Da auch Azide ansich inhibierende Wirkung auf Dehydrogenasen zeigen können, ist es zweckmäßig, das Bakteriostatikum  $\text{NaN}_3$  nur in Konzentrationen von etwa 0,0001 bis 0,01, vorzugsweise von 0,01 bis 0,05 Mol je Liter Behandlungslösung zuzugeben. In diesem Konzentrationsbereich wurde auch bei Alkohol-Dehydrogenase keine inhibierende Wirkung des Natriumazids beobachtet.

Wenn man eine solche Behandlungslösung, wie sie oben bezüglich der verschiedenen Komponenten beschrieben wurde, zur quantitativen Bestimmung von Ethanol mit Hilfe von Alkohol-Dehydrogenase verwendet, wobei Acetaldehyd gebildet wird, ist es erforderlich oder zumindest zweckmäßig, zur Beschleunigung der Reaktion durch Gleichgewichtsverschiebung den Acetaldehyd aus dem Reaktionsmedium abzufangen. Es sind verschiedene Abfangmittel hierzu bekannt, wie beispielsweise Senicarbazid oder die aus der US-PS 3 493 467 bekannten Hydroxylaminderivate, nämlich Aminoxyalkansäuren und Aminooxysulfonsäuren. Als besonders geeignet erwies sich jedoch nunmehr als Abfangmittel Serin, wie DL-Serin, das beispielsweise in Mengen von 0,001 bis 1 Mol pro Liter, vorzugsweise von 0,01 bis 0,5 Mol pro Liter Behandlungslösung eingesetzt werden kann.

Im übrigen setzt man der Behandlungslösung übliche Stoffe zu,

- 7 -  
- 10 -

die aus dem Stand der Technik bekannt sind. So wird für die quantitative Analyse der Behandlungslösung ein Coenzym zugegeben, wie NAD, wobei die zugegebenen Mengen hierbei dem Stand der Technik entsprechen.

#### Beispiel

Dieses Beispiel beschreibt die Zusammensetzung einer Behandlungslösung, die als Durchflußlösung in Verbindung mit trägergebundener Alkohol-Dehydrogenase geeignet ist. Diese Lösung enthält pro Liter:

67mmol  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$   
 0,699 g Albumin  
 30 mmol Glycin  
 0,036 mmol Cystein  
 100 mmol Serin (zum Abfangen des Acetaldehyds)  
 1 g  $\text{NaN}_3$  (als Bakterioostatikum)  
 1 g EDTA (zur Komplexbildung von Schwermetallionen)  
 2,1 mmol NAD (als Coenzym)

Zum Ansetzen der Lösung wurde bidestilliertes Wasser benutzt. Die Lösung besitzt direkt pH 9,5, was dem in der Literatur angegebenen pH-Optimum entspricht.